

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。筑波霊長類センターとの共同研究として厚生省霊長類共同利用施設で実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および筑波霊長類センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

- ・ AAV ベクターに関する基礎研究：骨格筋を標的とした AAV ベクターの *in vivo* 投与方法については、様々な種類の導入遺伝子を用いた検討において CMV プロモーターと 1 型由来のキャプシドを用いることで従来の結果よりも高い発現が認められた。また、脂肪細胞に対する遺伝子導入法の開発に向けてはプルロニック系界面活性剤を用いた場合に顕著な発現増強効果が得られた。新生マウスを用いた検討においては、5 型及び 1 型由来のベクターを用いて腹腔内投与を行うことで 2 型を用いた場合を大きく凌駕する血中濃度が得られた。
- ・ 凝固第Ⅷ、第Ⅸ因子遺伝子を搭載した AAV ベクターの開発：SCID マウス骨格筋にヒト凝固第Ⅸ因子を導入し 1 年間追跡したが、効果はほぼ同レベルで推移した。観察終了後の筋組織を検討した結果、免疫染色において陽性像が持続しており、筋組織には全く異常を認めなかった。
- ・ 遺伝子導入実験：特に霊長類（サル）にお

いてベクターを筋注投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行った。霊長類モデルにおいても骨格筋への遺伝子導入によって正常の 5 % 程度の血中濃度が得られた。ヒト型凝固第Ⅸ因子に対する抗体は様々な免疫抑制下においても遺伝子導入後 4 ないし 6 週で生起しており、これに引き続いて血中濃度の低下が観察された。

D. 考察

骨格筋に対する遺伝子導入法に関しては自験例を含めて世界中で様々なノウハウの蓄積が見られ、用いるベクターの血清型及びプロモーターについては条件の最適化が進行している。この条件は凝固第Ⅸ因子を導入する場合にも最適と考えられ、治療域と考えられる数パーセントレベルの血中濃度を達成することに大きな困難はなくなった。しかしながら導入遺伝子産物に対する免疫反応が予想より遙かに強いことも明らかとなっており、この点の改善が今後急務となる。これまで骨格筋は導入遺伝子産物の全身的な供給を期待する場合に好都合な標的組織と考えられてきたが、免疫反応を惹起するという観点からは理想的ではないかも知れない。本研究においては新規の標的として脂肪組織への遺伝子導入を行っているが、切除可能であるという安全性のみならず免疫反応に関しても有利である可能性があり、今後更に検討を要する。免疫反応の回避という点からは出生前もしくは直後の個体を対象にすることは重要であり、この場合トランスの誘導などが期待される。

血友病 B に対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的として 2 型 AAV

を用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても十分な効果は認められていないようである。また、より患者数の多い血友病 A の場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかりそうである。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて治療遺伝子を搭載した AAV ベクターを用いて検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果が得られるものと期待される。

E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。また、これらの条件を用いることで霊長類モデルにおいても治療域に達する効果を認めた。今後更に免疫学的な検討が必要であるが、以上の技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発に通じることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (原著論文)

Mizukami, H., Okada, T., Ogasawara, Y., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., and Ozawa, K.: Separate control of Rep and Cap expression utilizing mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol. Biotechnol.* (*in*

press)

Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K., Kume, A.: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther* (*in press*)

Mochizuki, S., Mizukami, H., Kume, A., Muramatsu, S., Takeuchi, K., Matsushita, T., Okada, T., Kobayashi, E., Hoshika, A., Ozawa, K.: Adeno-Associated Virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther and Mol Biol* (*in press*)

Mimuro, J., Mizukami, H., Ono, F., Madoiwa, S., Terao, K., Yoshioka, A., Ozawa, K., Sakata, Y.: Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *J. Thromb Haemost* (*in press*)

Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Ishibashi, K., Matsuzaki, T., Takata, K., Asano, Y., Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Virus Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 Vectors *In Vitro* and *In Vivo*. *Nephron* (*in press*)

Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K. and Saido, T.C.: Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J. Neurosci* 24: 991-998, 2004.

Ideno, J., Mizukami, H., Honda, K., Okada, T.,

Hanazono, Y., Kume, A., Saito, T., Ishibashi, S., and Ozawa, K.: Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector-expressing arginine-vasopressin in brattleboro rats. *Mol Ther* 8: 895-902, 2003.

Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., and Ozawa, K.: Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res.* 63: 5091-5094, 2003.

Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Sato, Y., Tobita, K., and Ozawa, K.: Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J. Gen. Virol.* 84: 2127-2132, 2003.

Xin, K.Q., Ooki, T., Jounai, N., Mizukami, H., Hamajima, K., Kojima, Y., Ohba, K., Toda, Y., Hirai, S., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV. *J. Gene. Med.* 5: 438-445, 2003.

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Katsura, K., Katayama, Y., and Ozawa, K.: Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5. *Neurosci. Lett.* 340: 153-157, 2003.

Lu, Y.-Y., Wang, L.J., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I.:

Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci. Res.* 45: 33-40, 2003.

Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, A., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 10: 51-58, 2003.

H. 知的所有権の出願・取得状況
該当なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

第3世代レンチウイルスベクターを用いた血友病A遺伝子治療（イヌモデル）
および肝臓外肝細胞移植による肝組織新生の試み

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

研究要旨；血友病Aのcureという観点から、患者が第Ⅷ因子製剤による補充療法に依存するのではなく、自らの生体内で一定の第Ⅷ因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減～脱却を計ることを目的とする。これにより、患者自身のQOLが著明に改善するのみならず、血液製剤由来の既知・未知の感染性病原体伝搬問題の解決や、非常に高価な第Ⅷ因子製剤の使用量の大幅な減少などが期待できる。これを達成するため、血友病Aの小動物（マウスモデル）と中動物（イヌモデル）を用いて、従来から行ってきた第3世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療と生体部分肝臓移植に継続した成熟肝細胞移植及び、肝臓外肝組織新生の基礎的研究を奈良県立医科大学消化器外科との共同研究として行った。KOマウスに、イヌ第Ⅷ因子遺伝子を担った組換えレンチウイルスを投与し、約20週間観察した。第Ⅷ因子活性は5～10%程度を維持し、抗原については1～2%のレベルを20週間維持した。いずれのKOマウスにおいてもインヒビターの存在はなかった。以上のことから、一度レンチウイルスで形質転換を図れば、比較的長期間の発現が得られるものと考えられた。

マウスを用いた、腎被膜下肝細胞移植実験において、移植肝細胞が長期生着する方法を確立し、移植肝細胞により構成される小肝組織作製が可能であり、それらは自己肝の一部として認識されていることを示した。

A. 研究目的

血友病Aは、X染色体に存在する血液凝固第Ⅷ因子遺伝子の異常に起因する先天性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第Ⅷ因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計る、という補充療法を主体とする血友病のcareである。今後さらに進めた血友病Aのcureという観点から、患者が第Ⅷ因子製剤による補充療法に依存するのではなく、自ら

の生体内で一定の第Ⅷ因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状の軽減～脱却を計ることを目的とする。これにより、患者自身のQOLが著明に改善するのみならず、血液製剤由来の既知・未知の感染性病原体伝搬問題の解決や、非常に高価な第Ⅷ因子製剤の使用量の大幅な減少などが期待できる。これを達成するため、血友病Aの小動物（マウスモデル）と中動物（イヌモデル）を用いて、従来から行ってきた第3世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

と生体部分肝臓移植に継続した成熟肝細胞移植及び、肝臓外肝組織新生の基礎的研究を奈良県立医科大学消化器外科との共同研究として行う。

肝細胞移植については、肝臓移植に替わるあらたな治療法として期待されており、これまでに全世界で50例を超える各種疾患患者への移植が行われ、その有効性が報告されている。これまでの肝細胞移植の細胞移植部位は、経門脈的に肝臓へ移植する方法が中心であった。一方で、肝細胞を肝臓外へ移植する研究においては、移植細胞の長期生着が困難であり、目覚ましい発展を見ていないのが現状である。しかしながら、肝細胞を肝臓外に長期生着させることが可能となれば、細胞移植により新たな肝組織を生体内で作製することも可能と考えられ、このような試みは臓器再生医療の展開において極めて重要なテーマの一つと認識されている。将来的な新しい血友病治療法の確立の観点からも、平成15年度において、我々は腎被膜下を移植部位の一つとして選択し、移植肝細胞の長期生着法の確立と、本手法を用いた肝組織作製の可能性につき研究を行った。

B. 研究方法

1) 第3世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

第3世代レンチウイルスベクターに肝細胞特異的プロモーター制御下にBドメインを欠失させたイヌ第Ⅷ因子遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作成した。肝臓を標的にした遺伝子導入のため、 10^8 ユニットの組換えウイルスを経門脈的に第Ⅷ因子ノックアウトマウス(KO マウス)に投与し、1~2週ごとに眼窩静脈叢から採血し、第Ⅷ因子活性と抗原を約20週にわたって観察した。イヌ第Ⅷ因子活性はヒト第Ⅷ因子欠乏血漿を用いた凝固1段階法で、イヌ第Ⅷ因子抗原は Asserachrom VIII:Ag kit (Diagnostica

Stago)を用いたELISA法で、それぞれ定量することによりその発現を評価した。発現したイヌ第Ⅷ因子に対する抑制抗体(インヒビター)はBethesda法を用いて測定した。

また、レンチウイルスベクターによる遺伝子治療は、細胞周期の問題から効率的な導入を図るためには肝臓の部分切除が必須との報告があるため、GFPを担った第3世代レンチウイルスベクターを作成し、肝臓部分切除を行った群と行わない群に分けて実験した。通常のマウスに経門脈的に投与し、2週間後に肝臓の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。

2) マウスを用いた腎被膜下肝細胞移植

2段階コラゲナーゼ灌流法により成熟マウスから肝細胞を分離し、低速遠心法にて99%以上に精製した後、実験に使用した。使用した動物は、肝細胞特異的にマーカー蛋白(ヒトアルファ1アンチトリプシン、hAAT)を分泌するマウス(米国オハイオ州立大より供与)をドナーとして用い、同系野生型マウスをレシピエントとして使用した。移植肝細胞の生着はレシピエントマウスの血中マーカー蛋白の推移および組織学的検討にて評価した。

C. 研究結果・考察・結論・今後の展望

1) 第3世代レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療

合計20尾のKOマウスに、 10^8 TU オーダーのイヌ第Ⅷ因子遺伝子を担った組換えレンチウイルスを投与した。1~2週毎に採血した結果、第Ⅷ因子活性については、第4週目で最高34%の活性を示し、20週目までおおよそ5~10%程度の活性を維持した。第Ⅷ因子抗原については、4週目で最高3.6%、おおよそ1%のレベルを20週間維持した。一部のマウスは8週目に開腹し下大静脈から採血し採血時の組織液の流入という純粋にテ

クニカル問題を回避した。いずれの K0 マウスにおいても第Ⅷ因子インヒビターの発生はなかった。以上のことから、一度レンチウイルスで形質転換を図れば、比較的長期間発現が持続するものと考えられた。長期間の発現維持を左右するインヒビターは、今回の検討では Betesda 法で測定する限り認めなかった。今後 ELISA 法など別の方法で抗体の存在を検索する必要がある。

GFP を担った組み換えウイルスを作成し、4尾の通常マウスの門脈内に投与し、2尾は肝臓の部分切除を施し、残りの2尾は肝臓の切除を行わず、2週間後の肝臓凍結切片を作成し、各マウスの肝臓の切片を各100視野観察し、GFP 陽性細胞数を数えた。肝部分切除した群と切除を行わなかった群における GFP 陽性細胞の数は、それぞれ1視野あたり平均4.12個と3.96個で、両群間に有意な差は認めなかった。導入された GFP 陽性細胞の内、約半数が肝細胞であった。肝細胞に導入された GFP 陽性細胞数は全肝細胞中約0.5%であった。レンチウイルスの導入に細胞周期の関与が示唆されているが、今回の検討ではウイルス骨格に central-polypyrimidine-tract (cPPT) を搭載していないにもかかわらず、導入効率に差異は認めなかった。

血友病 A イヌモデルについても、同様の遺伝子治療実験を行う予定であったが、年2回の妊娠機会に受胎せず、新しい血友病 A 犬を得ることが出来なかったので施行せず。今年度新生犬が生まれたら、生後1ヶ月の離乳をめどに行う予定である。

2) マウスを用いた 腎被膜下肝細胞移植

分離肝細胞を腎被膜下に (2×10^6 肝細胞/腎) 移植し、生存率を検討したところ、移植後2週間で30%以下へと急激に低下し、その後も持続的な低下が観察された。この生存率の低下の原因として、腎被膜下の血流不足

と細胞外マトリックス不足が考えられたが、マウス腎被膜下ラ氏島移植の我々の実験では、ラ氏島単独移植で長期生着が得られていることから、血流不足ではなく肝細胞の生着に必要なマトリックス成分の不足が原因と考えた。そこで、移植肝細胞にラミニンと4型コラーゲンに富む Basement Membrane Matrix Gel (BMM-Gel) を供給する目的で BMM-Gel と肝細胞との共移植の検討を行った。この検討にて、肝細胞の移植初期での生存の急激な低下は消失し、100日を超えて安定した生存を得た。移植後120日後における組織学的検討では、培養肝細胞で通常観察される細胞の癒合傾向は認められず、肝細胞特異的な形態を示していた。また、内皮細胞に裏打ちされた血管網と共存しており、小さいながら肝組織を形成していた。これらの肝組織は hAA、アルブミン、糖新生 (グリコーゲン) といった代表的肝機能を維持していた。

次に、腎被膜下に作製した小肝組織が生体内においていかに自己肝と関係を保つかにつき検討を加えた。同じく BMM-Gel と共に肝細胞を移植したマウスに、80日目に自己肝臓の70%を切除することにより内因性の肝再生刺激を誘導し、腎被膜下肝組織の変化を観察した。腎被膜下肝組織は自己肝の再生と関係して、ほぼ同等の肝再生力を発揮し、約2.5倍に再生増殖した。また、この再生した腎被膜下肝組織はその後70日間 (観察期間) にわたり長期に安定して存在することを確認した。以上の結果は、腎被膜下という肝臓外部において、肝細胞移植を行うことにより肝組織を作製し得ること、そして、その肝組織は生体内において自己の肝臓と関係し、自己肝の一部として存在し得ることを示すものである。

これらの結果を基に、平成16年度は、作製した肝組織の凝固因子や薬物代謝酵素等の評価を行い、血友病モデルマウスを用いた治療実験を行う予定である。さらに、肝細胞移

植部位として、空間的にも優位であり、将来の臨床応用の際には最も容易と考えられる『皮下』においても検討を加え、皮下肝組織作製を目指して研究を重ねる予定である。

研究発表

- 1) A. Yoshioka, K. Fukutake, J. Takamatsu, A. Shirahata, and the Kogenate Post-Marketing Surveillance Study Group: Clinical Evaluation of a Recombinant Factor VIII Preparation (Kogenate) in Previously Untreated Patients with Hemophilia A. *International journal of Hematology* 78: 467-474, 2003
- 2) M. Shibata, M. Shima, H. Misu, Y. Okimoto, J. C. Giddings and A. Yoshioka: Management of haemophilia B inhibitor patients with anaphylactic reactions to FIX concentrates. *Haemophilia* 9: 269-271, 2003
- 3) T. Matsutani, Y. Sakurai, T. Yoshioka, Y. Tsuruta, R. Suzuki, M. Shima, A. Yoshioka: Replacement therapy with plasma-derived factor VIII concentrates induces skew in T-cell receptor usage and clonal expansion of CD8+ T-cell in HIV-seronegative hemophilia patients. *Thrombosis and Haemostasis* 90: 279-292, 2003
- 4) Y. Morimoto, A. Yoshioka, M. Shima, T. Kirita: Intraoral Hemostasis Using a Recombinant Activated Factor VII Preparation in a Hemophilia A Patient With Inhibitor. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 61: 1095-1097, 2003
- 5) 嶋 緑倫: 第Ⅷ因子インヒビター陽性血友病A *臨床血液* 44(2):90-101, 2003
- 6) 松本智子、嶋 緑倫: 凝固波形解析と第Ⅷ因子微量測定への応用 *血栓止血誌* 14(2):122-127, 2003
- 7) 嶋 緑倫、田中一郎、河合陽子、辻 肇、中村 伸、森田隆司: 本邦における血液凝固

後天性インヒビターの実態: *血栓止血誌* 14(2)107-121, 2003

8) 嶋 緑倫: 血友病インヒビター症例における ITI と国際研究 *日児血会誌* 17:157-161 2003

9) K. Fukuda, H. Naka, S. Morichika, M. Shibata, I. Tanaka, M. Shima and A. Yoshioka: Inversion of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. (2004, in press)

10) Park F, Ohashi K, Kay MA. The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Mol Ther.* 8(2):314-23, 2003

11) Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee SY, Salazar FH, Marion PL, Ohashi K, Meuse L, Kay MA, Casey JL, Sebt SM, Hamilton AD, Glenn JS. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest.* 112(3):407-14, 2003

12) Ohashi K, Kay MA. Extracellular matrix component co-transplantation prolongs survival of heterotopically transplanted human hepatocytes in mice. *Transplantation proc.* (2004, in press).

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

センダイウイルス F、HN タンパク質を用いたシュウドタイプ SIV ベクター開発と
血友病遺伝子治療への応用

分担研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所

研究要旨 血友病 A 遺伝子治療用レンチウイルスベクターとしてサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターを開発してきた。これまではレンチウイルスベクターに広く用いられているヒト水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質 (VSV-G) をそのエンベロープタンパク質に用い、SIV ベクター開発を行ってきたが、より広範囲の組織に対する高い遺伝子導入効率を期待して、センダイウイルス (SeV) のエンベロープタンパク質である、F、HN タンパク質を用いたシュウドタイプを開発した。この新規 F/HN シュウドタイプ SIV ベクターをマウス鼻孔より肺に投与した結果、気道粘膜を通過して気管上皮細胞や肺胞上皮細胞への遺伝子導入が明らかになった。この感染は VSV-G シュウドタイプ SIV ベクターでは観察されず、これまでにいわれてきたように気道粘膜を通過できない VSV-G シュウドタイプベクターに対し、*in vivo* で気道感染に関して明らかに F/HN-SIV ベクターが優位性を示した。また、ヒト由来の細胞株を用いた、VSV-G シュウドタイプと F/HN シュウドタイプの感染性を比較した結果、VSV-G より感染性が勝る細胞種もあった。気道組織での分泌タンパク質は血中へ移行が容易であるため、気道は血友病遺伝子治療の標的組織の一つとなり得る。このような点から、F/HN シュウドタイプベクターは、有効な血友病遺伝子治療の実現に大いに役立つと考えられる。

A. 研究目的

VSV-G を用いたシュウドタイプベクターは広範囲の細胞種に対し効率よく遺伝子導入することが知られている。しかしながら、気道の粘膜上皮細胞等 VSV-G で遺伝子導入がほとんど見られない組織も存在する。センダイウイルス (SeV) は気道感染するウイルスであり、このウイルスを基に作製された SeV ベクターは気道組織に限らず、神経、筋肉等広範囲の組織に対し、効率よく遺伝子導入することが知られている。従って、この SeV のエンベロープである F、HN タンパク質を用いた、シュウドタイプレンチウイルスベクターは、SeV の広い感染性とレンチウイルスの特徴である細胞周期によらない

遺伝子導入能を兼ね備える有用なベクターとなりうる。また、挿入可能な遺伝子のサイズも比較的大きいため、血友病 A の遺伝子治療の最適なベクターとなる。

SeV の F、HN タンパク質はそれぞれ、ウイルス粒子と細胞の融合、ウイルス粒子の細胞表面への吸着というウイルス感染に必要かつ十分な機能を持つと考えられている。これまでの研究から、F、HN を用いたシュウドタイプ SIV ベクターの作製には、F、HN をインタクトな形で SIV ベクターの生産細胞に発現させるだけでは感染性を有するベクター粒子はほとんど得られず、F はその細胞質領域を 4 アミノ酸まで短鎖化したもの (Fct4)、HN は細胞質領域

にさらに SIV エンベロープタンパク質の細胞質領域に由来する領域を付加したもの (tc+HN) を組合せることにより感染性のあるベクターを作製できることが明らかになった。しかしその生産力価は 10^4 TU/ml 程度で、実用性にはまだ十分とは言えなかった。その後の検討により、SIV ベクター骨格に central polypurine tract (cPPT) 配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調整因子 (WPRE) の配列を導入することにより、VSV-G シュウドタイプベクターの性能、生産性に著しい向上が見られることが分かった。cPPT 配列は、ウイルスの複製サイクルにおいて逆転写、逆転写による DNA の核内への移行の効率を高め、WPRE 配列は RNA の安定性を促進する。この改良により、F/HN シュウドタイプの問題であった生産力価を高め、in vivo での感染性、特に気道における感染性の検討を行い、F/HN 有用性を調べることが研究目的である。

また、いくつかの株化細胞を用い、感染力価を揃えた VSV-G シュウドタイプ SIV ベクター (VSV-G-SIV ベクター) と F/HN シュウドタイプ SIV ベクター (F/HN-SIV ベクター) とを比較し、気道以外の有用な標的組織の候補探索を開始した。

B. 研究方法

SIV ベクターの基になっている SIVagmTYO-1 株ゲノム由来の cPPT 配列 (130bp) を内部プロモーターの上流部分に、WPRE 配列 (600bp) を導入遺伝子と 3'側 LTR との間に挿入した遺伝子導入プラスミドを、F/HN シュウドタイプベクター作製に開発した、Fct4 発現プラスミド、tc+HN。発現プラスミドを SIV パッケージングベクターと共に 293T 細胞にトランスフェクションし、F/HN-SIV ベクターを作製した。このベクターは F タンパク質活性化のため細胞外領域のトリプシンによる解裂が必要になるためトランスフェクシ

ョン 24 時間後より、無血清培地中でのトリプシン処理を行った。ベクターの機能力価はベクター生産細胞の培養上清を希釈して 293T 細胞に感染させ、陽性細胞の数をカウントする方法によって測定した。

GFP を搭載した F/HN-SIV ベクターを 42,500G にて 500 倍程度の遠心濃縮を行った。濃縮ベクターは機能力価を確認した後、マウス肺投与実験に用いた。

10^9 TU/100ml になるように調製したベクター溶液をマウス鼻孔より吸引させることにより、肺への投与を行った。投与 3 日後と 10 日後に肺を摘出し、GFP の発現を観察した。対照には VSV-G-SIV ベクターを同力価になるように調製して用いた。

また、上記 GFP 搭載 F/HN-SIV ベクター、VSV-G-SIV ベクターを 293T 細胞に感染させ、感染力価を測定後、感染力価を同一になるように調製した後、moi を揃えて、HeLa 細胞、BEAS-2B 細胞、HepG2 細胞に感染させ、2 日後に GFP 発現細胞の割合をフローサイトメータにより感染効率を求めた。

C. 研究結果

F/HN-SIV ベクター (cPPT、WPRE 非搭載) が 10^4 TU/ml の生産力だったのに対し cPPT-WPRE 搭載 F/HN ベクターは 10^6 から 10^7 TU/ml にまで生産性が向上した。濃縮も VSV-G-SIV ベクターと同様、42,500G の遠心により、容易に濃縮することが可能であった。

10^9 /ml まで濃縮した F/HN-SIV ベクターおよび VSV-G-SIV ベクターを用い、マウス肺に投与した結果、3 日後、10 日後において、F/HN-SIV ベクターは肺の細気管支粘膜上皮細胞および肺胞上皮細胞に感染したのに対し、VSV-G-SIV ベクターはそれらの細胞には全く感染しなかった。また、10 日後の GFP は 3 日後に比べてより強く発現していた。

株化細胞に関しては、HepG2 細胞、BEAS-2B 細胞に関しては F/HN-SIV ベクターと VSV-G-SIV ベクターとほぼ同等の感染性を示したが、HeLa 細胞では、F/HN-SIV ベクターは VSV-G-SIV ベクターのほぼ 2 倍高い感染性を示した。

D. 考察

レンチウイルスベクターは VSV-G を用いたシュウドタイプベクターとして広く研究されてきたが、このシュウドタイプベクターは気道など感染しにくい組織の存在も指摘されてきた。F/HN を用いたシュウドタイプ SIV ベクターも開発したが、その感染性の確認に必要な感染力価が得られていなかった。本研究により、実用的な感染力価の F/HN シュウドタイプ SIV ベクターの調製に成功し、動物実験に進むことができた。その結果、期待通り F/HN の作用により気道粘膜を通過し、気道組織へ感染に成功した。肺は目的タンパク質を血中に高濃度で放出するという点で血友病は遺伝子治療の標的となりうる器官であり、今後治療遺伝子搭載ベクターを用いた検討が必要となる。また HeLa への感染性の高さから、肺以外でも VSV-G よりも高い効率で導入される組織の存在が示唆された。これまでに考えられてきた脂肪組織や造血組織等の標的組織だけでなく標的組織の候補に対し、この F/HN-SIV ベクターを用いた検討をすることで、凝血因子の発現を高めることが期待される。

E. 結論

cPPT、WPRE を搭載することで、F/HN シュウドタイプ SIV ベクターの生産性が著しく増大した。このベクターを用いマウス肺に投与した結果、VSV-G シュウドタイプベクターでは感染できなかった気道組織に遺伝子導入が可能であり、今後血友病遺伝子治療の新たなツールとなる可能性を示唆するデータを得た。

F. 健康危険情報

SIV ベクターの基本骨格となっている SIVagm TYO-1 株は自然宿主であるアフリカミドリザルに対しても病原性はなくヒトに対しても病原性が知られていない。また、HIV ウイルスゲノムとの配列の相同性は 30-60% と低く、HIV ベクターと異なりベクター投与細胞に HIV ウイルスが感染しても、ベクター-ウイルス間での組換えにより搭載遺伝子を持つ感染性粒子の出現頻度は低いと考えられる。またこれまで本ベクター生産系で複製可能粒子の検出を行ったが、全て検出限界以下であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther.* 2004 11(3): 253-9.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

AAV1 ベクターを用いた WPRE の血友病遺伝子発現効果に関する研究

分担研究者 新井 盛夫 東京医科大学

研究要旨：

遺伝子組換え活性型第 VII 因子(rFVIIa)は、インヒビター保有血友病患者の止血治療薬として臨床で広く用いられている。FVIIa は組織因子の存在下に第 X 因子および第 IX 因子を活性化することに加えて、リン脂質膜上で第 X 因子を直接活性化する機序が知られている。我々は、FVIIa がウロキナーゼ (uPA) のクリングルドメインに結合し線溶活性を増強させることを報告した。本研究ではさらに、クリングルドメインを有するプロトロンビンと FVIIa との相互作用を検討した。FVIIa は陰性荷電リン脂質の存在下で濃度依存性にプロトロンビンの活性化を促進させた。その効果は第 Va 因子の存在下で著明に促進し、活性化効率は 2989 倍に高まった (km: $4.6 \mu\text{M} \rightarrow 1.1 \mu\text{M}$, kcat: $0.0002 \text{ min}^{-1} \rightarrow 0.1429 \text{ min}^{-1}$)。また、プロトロンビンと FVIIa は KD 43 nM で結合した。これらより、FVIIa は治療レベルの血漿濃度 (50 nM) において、活性化血小板膜表面上でプロトロンビンおよび第 Va 因子と複合体を形成し、止血局所でのプロトロンビンバーストに寄与することが推測された。

A. 研究目的

遺伝子組換え活性型第 VII 因子(rFVIIa) は、2000 年 5 月にインヒビター保有血友病患者の止血治療薬として承認された。同薬の臨床的止血効果は高く、血栓性副作用が少ないことから臨床で広く用いられている。FVIIa は組織因子の存在下に第 X 因子および第 IX 因子を活性化することに加えて、リン脂質膜上で第 X 因子を直接活性化する機序が知られている。一方で、FVIIa は第 X 因子欠損症の止血に有効であったとする症例報告がある。また、FVIIa が第 X 因子欠乏血漿のプロトロンビン時間を短縮することも示されており、第 X 因子を介在しない止血機序の可能性も示唆されている。我々は、FVIIa がウロキナーゼ (uPA) のクリングルドメインに結合し、線溶活性を増強させることを報告した (第 24 回日本血栓止血学会学術集会)。このような FVIIa のクリングルドメインとの相互作用を鑑み、2

個のクリングルドメインを有するプロトロンビンとの相互作用を検討した。

B. 研究方法

① リン脂質リポソームの作成：phosphatidylserine (PS) および phosphatidylcholine (PC) をモル比 20:80 で混和し、ガラス試験管内で乾燥固着後、TBS 緩衝液中で超音波処理し、さらに孔径 50nm の膜を通して均一化したリポソームを作成した。対照として PC 100% のリポソームを同様に作成した。

② FVIIa によるプロトロンビンの活性化：純化系で FVIIa によるプロトロンビンの活性化を、リン脂質リポソーム (PS/PC, 20/80; mol/mol)、第 VIII 因子 (FVIII)、第 V 因子 (FV)、第 Va 因子 (FVa) の各種の組み合わせの存在下で測定した。各種濃度の各因子の混合液を 37°C で 20 分間反応後、プロトロンビンの生成を S-2238 の水解活性速度の変化から測定した。

③ FVIIa とプロトロンビンの結合実験：Biotin-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone(BFPRck)で活性基をブロックした FVIIa をアビジンが誘導された SA センサーチップに固定化し、プロトロンビンとの結合性を表面プラズモン共鳴により測定した。

④ FVIIa によるプロトロンビンの経時的な水解：FVIIa によるプロトロンビンの活性化反応を、経時的に 60 分後までサンプリングし、SDS-PAGE 後に抗プロトロンビン抗体で western blotting した。別のサンプルは S-2238 の水解速度を測定した。

C. 研究結果

FVIIa は陰性荷電リン脂質(PS/PC)の存在下で濃度依存性にプロトロンビンの活性化を促進させた。その反応は補因子として FVIII による影響は認めなかったが、FVa の存在下で著明に促進し、水解効率は 2989 倍に高まった (k_m : 4.6 μM →1.1 μM , k_{cat} : 0.0002 min^{-1} →0.1429 min^{-1})。FV および FVa は共に濃度依存性に FVIIa によるプロトロンビンの活性化を促進させたが、後者は前者の約 10 倍の効率を示した。プロトロンビンと BFPRck-VIIa は KD 43 nM で結合した。FVIIa は PS/PC、FVa の存在下で 78 kDa のプロトロンビンを経時的に水解し、36 kDa の α -トロロンビンのバンドが出現した。

D. 考察

治療血漿濃度 (50 nM) の rFVIIa は、酸性リン脂質膜上で FV (FVa) の存在下にプロトロンビナーゼ複合体 (FVIIa/プロトロンビン/FV(a)/リン脂質) を形成し、局所にトロロンビンを生成させることが推測された。出血局所に粘着した血小板はその活性化に伴いリン脂質二重膜内側の酸性リン脂質が外側に反転 (flip-flop) し、さらに血小板内の FV は血小板活性化により α 顆粒から細

胞膜表面に移動する。FVIIa とプロトロンビンの反応の場が、局所に濃縮、増幅されることは効率的な止血機序として極めて重要であると考えられる。FVIIa とプロトロンビンの反応動態の各パラメーターからは、本機構は、血中の生理的 FVIIa 濃度の約 500 倍の rFVIIa を付与した時に現れる薬理的な止血機序と考えられ、また、これらの反応は液相中では起こらないことが理解できる。臨床的に rFVIIa 治療による血栓症や DIC の有害事象が非常に少ないことも本研究の知見が裏付けとなる。

rFVIIa は、元来インヒビター保有血友病患者の止血治療薬として臨床応用された。その後、各種の凝固因子欠損症や異常症、血小板機能異常症の出血治療にも応用され、さらには健常者の難治性出血、外科的出血、外傷出血にも有効であることが示されている。本研究で得られた知見はこれらの一般的止血機序の一部を説明するものであり、今後、各疾患で予定されている rFVIIa の臨床試験における基礎データとなる。

E. 結論

治療濃度の FVIIa (>50 nM) は、酸性リン脂質上でプロトロンビン、FV(a) と共にプロトロンビナーゼ複合体を形成し、トロロンビンを生成する。

G. 発表論文リスト

1. 日笠 聡、三間屋純一、新井盛夫、白石 睦、小松京子、吉岡章 ほか: 血友病家庭療法の再評価と保険適応外治療の方向性. 血栓止血誌 2003; 14(2):134-159
2. 萩原剛、新井盛夫、山中晃、藤田進、高橋一郎、川田和秀、大石毅、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸: 血友病ハイ

- レスポナーインヒビター保有患者に対する凝固因子製剤によるインヒビターの中和と持続輸注療法. 血栓止血誌 2003; 14(4):337-344
3. 日笠 聡、新井盛夫、嶋緑倫、白幡聡、田昇、高松純樹、瀧正志、花房秀次、福武勝幸、三間屋純一、吉岡章: 血友病在宅自己注射療法の基本ガイドライン. 血栓止血誌 2003; 14(4):350-358
 4. 新井盛夫: Inhibitors in Patients with Haemophilia 日本語版刊行にあたって. 2003
 5. Kaneko M, Cuyun-Lira O, Takafuta T, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Ohtsuki K, Ohnishi M, Arai M, Yatomi Y, Ozaki Y: Mechanisms of platelet retention in the collagen-coated bead column. *J lab Clin Med* 2003; 142:258-267
 6. Nagaizumi K, Inaba H, Amano K, Suzuki M, Arai M, Fukutake K: Five novel and four recurrent point mutations in the antithrombin gene causing venous thrombosis. *Int J Hematol* 2003; 78:79-83
 7. 佐々木昭仁、永泉圭子、稲葉 浩、鈴木隆史、新井盛夫、福武勝幸: 日本人血友病B患者に認められた18種類の遺伝子変異. 血栓止血誌 2004;15 (印刷中)
 8. 新井盛夫、高山朋子、高橋敬: 活性型第VII因子によるプロトロンビンの活性化. 血栓止血誌 2003; 14(5):436 (抄録)
 9. 高橋敬、新井盛夫、中村伸: クリッグルと凝固因子VII/組織因子(TF)で再構成したグリセリン処理細胞の線溶・凝固活性. 血栓止血誌 2003; 14(5):448 (抄録)

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

肝選択的遺伝子導入法の開発とその有効性の検討

分担研究者 小林 英司 自治医科大学 教授

研究要旨

〔目的〕 血友病に対し新しい治療法を開発するため、動物での *In vivo* 技術開発を中心に分担研究を行った。特に遺伝子治療開発において、これまで以上に安全な方法として肝選択的遺伝子導入法の検討を行った。

〔方法〕 動物モデルにおいてウイルス及び非ウイルスベクターを血管カテーテル法を利用し、肝臓特異的遺伝子導入を試みた。

〔結果〕 血管カテーテルを用いて高濃度のウイルス性ベクターまたは非ウイルス性ベクターを肝に注入することにより、肝選択的に遺伝子を発現させることが可能であった。

〔考察〕 今後 AAV ベクターのような長期発現が安定的に得られるベクターを用い、さらに肝に指向性が高いものを開発することで、これまで以上に有効かつ安全な血友病遺伝子治療が期待される。

A.研究目的

現在、米国では血友病に対し欠損血液凝固因子（第 VIII 因子及び第 IX 因子）を補う方法として、遺伝子治療が試みられている。しかし使用するベクター及び遺伝子発現を生じさせる場所などに関連し、安全性及び有効性に問題が生じ、さらなる研究が必要であることが指摘されている。肝臓への遺伝子導入は本来肝が酵素等のタンパク質を産生する場所であり、外来性物質の産生に優れていることから、分泌型タンパク質誘導の場として最も有望であり、すでに一部臨床でも試みられている。さらに安全性を高めるには種々のベクターの特性を検討することと共に、他の全身臓器に不必要な影響を及ぼすことなく、肝臓へ“部分的”に遺伝子導入が試みられるべきである。仮に肝臓に部分的な発現誘導が可能であれば、過剰発現等による副作用出現時にも幹部文節序の対応が可能でありこれまで以上に安全である。

そこで、本研究は、現在広く臨床で使用

されているカテーテル法を用いて、現在得られている遺伝子導入ベクター（ウイルス性及び非ウイルス性）による肝臓選択的な遺伝子発現を試みた。さらに局所投与の優位性を明らかにすべく、全身投与との比較を行った。人での治療的投与を念頭に置き、実験動物としては、ラットのみならず、より人に近いとされるブタでも実験を行った。

B.研究方法

使用動物：

種々のベクターの検討では雄性成熟ラットを使用した。

肝亜区域選択的導入法では幼少家畜ブタを使用した。

検討ベクター：

①ウイルス性

- ・アデノウイルスベクター
- ・AAV (1~5 型タイプ)

②非ウイルス性

- ・HVJ-E
- ・Naked DNA

実験 1:

アデノウイルスベクターを用いて全身投与時の全身臓器での発現を確認した。次に全身投与及び肝動脈内投与による遺伝子発現量を比較した。さらに 1~5 型の AAV ベクターを用いて全身投与での肝臓での発現を比較検討した。また通常では遺伝子導入効率が極めて悪い臓器での導入効率を上げるため、血管カテーテルを用いてベクターと臓器の接触時間を上げ、その発現を検討した。

実験 2:

血管カテーテルにて肝静脈から高速で Naked DNA を注入し遺伝子発現を検討した。さらにブタを用いて外頸静脈経路でバルーン付カテーテルを挿入し、造影にて位置を確認し留置後、パワーインジェクターを用いて Naked DNA をカテーテルより注入しマーカー遺伝子の肝亜区域での発現を検討した。

全ての動物実験は、自治医大動物実験指針ならびに動物実験に係る諸規則に則り実験は行われた。

C.結果

実験 1:

アデノウイルスベクターを全身投与した際は肝のみでの発現が認められた。同量のベクターを投与する際は、肝動脈から投与することでより強い発現が得られた。1~5 型の AAV ベクターの内、全身投与で肝臓に発現が得られるものは 5 型のみであった。しかしその際も遺伝子マーカー陽性肝細胞はアデノウイルスベクターによるものに比し極めて少

なかった。しかし発現が誘導できない腎においても血管カテーテル法を用いることで AAV-2 でその発現が得られた。

実験 2:

肝静脈からのカテーテル法で Naked DNA を注入したところ、全葉に極めて高い発現が一過性に得られた。さらに亜区域にバルーンを誘導し、遺伝子を導入することでその区域に局限してマーカー遺伝子陽性細胞を得た。同法は、ブタ肝でも確認され臨床応用の可能性を示した。

D.考察

一般にアデノウイルスベクターは高発現であるか、短期一過性発現である。AAV ベクターは発現が低い長期安定である。本研究では血管カテーテルを用いて肝への指向性を高めこれらのウイルスベクターと臓器との接着時間を延ばすことでより効率にしかも限局性に遺伝子発現が誘導できることが示された。今回、開発した肝亜区域誘導型の遺伝子導入法は肝指向性の強いベクターとの組み合わせによりこれまででない安全な遺伝子導入が期待される。

E.結論

ウイルス性及び非ウイルス性ベクターの肝での発現特性を検討した。血液凝固因子遺伝子を肝亜区域に導入する技術を開発した。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Takeda, S., Takahashi, M.,

- Mizukami, H., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., Kobayashi, E., Asano, Y., Kusano, E.: Successful Gene Transfer Using Adeno-Associated Virus Vectors into the Kidney: Comparison among Adeno-Associated Virus Serotype 1 to 5 Vectors *in vitro* and *in vivo*. *Nephron*(in press)
2. Inoue, S., Hakamata, Y., Kaneko, M., and Kobayashi, E.: Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA DNA-application to the rat liver. *Transplantation* (in press)
 3. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. *Transplant Immunol* 11:7-14, 2003
 4. Nagata, M., Takahashi, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Suemori, M., Ikeda, U., Nakano, I., Kobayashi, E., Hasegawa, M., Ozawa, K., Nakatsuji, N. and Shimada, K.: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med* 5(11): 921-928, 2003
 5. Sato, Y., Ajiki, T., Inoue, S., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., and Kobayashi, E.: A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: Long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. *Transplantation* 15:76(9):1294-8, 2003
 6. Nakamura, M., Wang, J., Murakami, T., Ajiki, T., Hakamata, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okamoto, H., Mayumi, M. and Kobayashi, E.: DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. *Transplantation* 76:1369-75, 2003
 7. Mochizuki, S., Mizukami, H., Ogura, T., Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Matsubara, Y., Kobayashi, E., Okada, T., Hoshika, A., Ozawa, K. and Kume, A.: Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Therapy* (in press)
 8. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Arai, M., Sugo, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A. *J Thrombosis haemostasis*(in press)

2. 学会発表

国内 23 件

- 1) 永田三保子、高橋将文、村松慎一、上田泰次、花園 豊、末盛博文、池田宇一、中野今治、小林英司、長谷川譲、小澤敬也、中辻野憲夫、島田和幸：サル ES 細胞由来心筋細胞への遺伝子導入。第 2 回日本再生医療学会総会、神戸、2003 年 3 月 11-12 日。(再生医療 2(Suppl):105, 2003)
- 2) Takahashi, M., Nagata, M., Muramatsu, S., Ueda, Y., Hanazono, Y., Takeuchi, K., Okada, K., Hasegawa, M., Suemori, M., Nakatuji, N., Ikeda, U., Kobayashi, E., Shimada, K.: Efficient Transduction of Primate Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using a Simian Immunodeficiency Virus Vector. The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, March 28-30, 2003. (Circulation Journal 67(Suppl. 1):305, 2003)
- 3) Takahashi, M., Hakamata, Y., Kaneko, T., Ikeda, U., Shimada, K., Kobayashi, E.: Rats Transgenic for Green Fluorescent Protein and LacZ: Novel and Useful Tools for Regenerative Research in the Myocardium. The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, March 28-30, 2003. (Circulation Journal 67(Suppl. 1):305, 2003)
- 4) 吉野浩之、山内 仁、井上成一郎、藤代 準、清水 尚、小林英司、水田耕一、河原秀夫：ブタにおけるピギーバック型肝移植。第 21 回日本肝移植研究会、長崎、2003 年 4 月 10-11 日 (抄録集 p95)
- 5) 安食孝士、村上 孝、袴田陽二、金子隆志、高橋将文、刈谷裕成、星野雄一、小林英司：遺伝子銃の局所免疫療法—サイトカインおよびワクチン療法のための基礎— 第 24 回癌免疫外科研究会・第 25 回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング 合同シンポジウム・局所療法と免疫療法の接点、2003 年 6 月 19 日 (抄録集 p33)
- 6) Igarashi, Y., Sato, Y., Hakamata, Y., Kaneko, T., Murakami, T., Takahashi, M., and Kobayashi, E.: Cell parking of GFP positive bone marrow cells after intra-portal injection in rats. The 12th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Utsunomiya, June 19-20, 2003
- 7) 安食孝士、佐藤友紀、木村敦、袴田陽二、金子隆志、高橋将文、村上孝、刈谷裕成、星野雄一、小林英司：移植四肢への新しい非ウイルス性遺伝子導入法の応用。第 22 回日本運動器移植・再生医学研究会、大阪、2003 年 10 月 25 日 (抄録集 p32)
- 8) 木村敦、安食孝士、袴田陽二、高橋将文、刈谷裕成、星野雄一、小林英司：移植・再生研究の新しい武器—トランスジェニックラットの開発—。第 22 回日本運動器移植・再生医学研究会、大阪、2003 年 10 月 25 日 (抄録集 p41)

- 9) 小林英司、井上成一朗、安食孝士、佐藤友紀、武田真一、清水尚、吉野浩之、藤代準、竹野勇一、五十嵐友香、袴田陽二、金子隆志、村上孝、高橋将文：移植臓器への遺伝子導入法とその応用。第39回日本移植学会総会、大阪、2003年10月26-27日 移植 38:135,2003
- 10) 高橋将文、袴田陽二、武田真一、佐藤友紀、井上成一朗、清水尚、吉野浩之、安食孝士、藤代準、竹野勇一、五十嵐友香、金子隆志、村上孝、高橋利一、上田正次、小林英司：移植・再生研究に有用なレポーター遺伝子トランスジェニックラットの開発。第39回日本移植学会総会、大阪、2003年10月26-27日 移植 38: 142,2003

G. 特許獲得なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

血友病の遺伝子治療用レンチウイルスベクターの開発と安全性の評価に関する研究

分担研究者 北村義浩 東京大学医科学研究所先端医療研究センター 感染症分野助教授

研究要旨

血友病を遺伝子治療で治療する場合、血液幹細胞に治療遺伝子を安定的に発現させることが必要である。この目的に近年ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を基にしたベクターが用いられてくるようになった。しかし、効率の良い安全な HIV ベクターを確立するためには未だ解明すべき点が多い。HIV は感染後細胞内でウイルスゲノム RNA を相補 DNA に変換して組み換え前複合体を形成し、その後核内に移行し宿主染色体に入り込む。この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにし、これをベクター開発に応用することを目的とし研究を行った。HIV のウイルス中央多プリン配列（cPPT）を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量を低下させる働きのあることも明らかにした。

A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD 4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素（RT）によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素（IN）を含む様々なタンパク質とともに沈降係数が 300S 以上の大きな核酸-タンパク質複合体（組み込み前複合体、preintegration complex; PIC）を形成する。しかし、この構造について、cDNA、IN、RT が含まれること以外は、具体的ことはほとんど分かっていない。PIC に Vpr、MA、などウイルスタンパク質の他、さらに、宿主の HMG-I (Y) タンパク質などが共存し

ているという報告が散見されるもののその報告者とは異なる研究者による厳密な検証はなされていないので、真偽は不明である。さらに、メカニズムは不明であるが、この巨大核酸タンパク質複合体（PIC）は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込み（狭義の組み込み反応）を起こしてプロウイルスとなる。この一連の過程はレトロウイルスに特徴的な反応なので、この過程を特異的に阻害することは理論上可能である。そのような制御が可能になれば、治療に大いに役立つであろう。本研究は、この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにする事を目的とする。

B. 研究方法と結果

まず HIV をベースにしたベクターを作製した。ベースとして採用したのは HXN ベクター（島田隆博士より供与を受けた）である。HIV-1 の構造から、5' の LTR、3' の LTR、gag, の 5' 末端領域以外の gag のほぼ全部、pol, env が欠失している。かわりに、Tk プロモーターでドライブされる neomycin 耐性遺伝子が組み込まれている。従ってこのベクターが組み込まれた細胞は G418 に耐性となる。従来 HIV ベクターに HIV のウイルス中央多プリン配列 (cPPT) を挿入すると遺伝子導入効率が高まるとされてきた。そこで、HXN の Tk プロモーターのすぐ上流に従来報告されていた 178 塩基の cPPT または、それを含みさらにそれよりも長い 282 塩基の cPPT を挿入したベクターを作製しその量を p24 量と RNA 量で定量した。遺伝子導入効率、組み込み効率、核移行効率を調べた。遺伝子導入効率は同じ p24 量 (1ng 程度) のベクターを HeLa 細胞に感染させ、出現する G418 耐性細胞コロニー数で定量した。282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が効率が 15%程度にまで低下した。挿入の向きに依存しなかった。178 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が逆に 200%程度にまで上昇した。これも挿入の向きに依存しなかった。核移行効率は 2LTR 接合領域を PCR 法で増幅して半定量的に調べた。HIV の cPPT を含む 178 塩基の領域を有する HIV ベクターではそうでない HIV ベク

ターに比べて遺伝子導入効率がよく、これは向きに依存すると一般には信じられてきた。そのメカニズムは cPPT を挿入することによって生ずると信じられている cDNA の当該領域部の DNA flap が cDNA の細胞核への移行効率を高めるためであろうと信じられている。そこで我々の系でベクターの cDNA の核移行の程度を調べた。282 塩基長であれ 178 塩基長であれ cPPT 領域を有する HXN ベクターとそうでない HXN ベクターで核移行の程度は同じであった。組み込み効率はいわゆる Alu-PCR 法で組み込み接合領域を増幅して半定量的に調べた。遺伝子導入効率から予想されたように組み込み効率は 282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターでのみ低下していた。282 塩基長と 178 塩基長の 2 つの cPPT の差である 104 塩基長の配列を有する HXN ベクターを作製しようと、その構造を有する DNA を 293T 細胞にトランスフェクトしてもベクターは産生されなかった。293T 細胞でベクターRNA が全く合成されなかったことが原因であることが分かった。

(倫理面での配慮)

該当しない

C. 考察

cPPT を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する可能性があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関